

MINISTERIO DE SALUD
ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE LABORATORIOS E INSTITUTOS DE SALUD "Dr. Carlos G. Malbrán"

ADMINISTRACION NACIONAL DE LABORATORIOS
E INSTITUTOS DE SALUD "Dr. Carlos G. Malbrán"



**INSTITUTO NACIONAL
DE PARASITOLOGIA**
"DR. MARIO FATALA CHABEN"

NORMAS PARA EL
DIAGNÓSTICO
DE LA
INFECCIÓN CHAGÁSICA

RESOLUCIÓN MINISTERIAL N° 523/97

MINISTERIO DE SALUD Y ACCIÓN SOCIAL

DR. ALBERTO J. MAZZA

SECRETARÍA DE PROGRAMAS DE SALUD

DR. VÍCTOR HUGO MARTÍNEZ

SUBSECRETARÍA DE ATENCIÓN COMUNITARIA

DRA. DORA VILAR DE SARÁCHAGA

**ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE LABORATORIOS E INSTITUTOS DE
SALUD**

“DR. CARLOS G. MALBRÁN”

DRA. ELSA LEONOR SEGURA

INSTITUTO NACIONAL DE PARASITOLOGÍA

“DR. MARIO FATALA CHABÉN”

DR. ANDRÉS MARIANO RUIZ

PRESENTACIÓN

Desde 1983 se organizan reuniones de concertación con expertos para la actualización de las Normas de Diagnóstico para la infección por *Trypanosoma cruzi*.

Los procedimientos del presente documento fueron elaborados en el ex Instituto Nacional de Chagas (INDIECH) por la Doctora Elsa Leonor Segura, Doctor Andrés Mariano Ruiz, Bioquímica Ana María De Rissio y Bioquímica-Farmacéutica Estela Norma Cura.

Estas normas incluyen, por primera vez, procedimientos para el control de calidad interno de la serología de infección por *T. cruzi*, elaborados en el por entonces Departamento de Control de Calidad a cargo de la Bioquímica-Farmacéutica Estela N. Cura.

Todos los profesionales del ex INDIECH participaron en la corrección final del presente documento.

El diseño e impresión de esta segunda edición fué realizada por el Servicio de Docencia, a cargo del Lic. Raúl Conforti, del Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chabén" en el mes de enero de 1999.

El papel utilizado en esta edición que consta

INTRODUCCIÓN

El entonces Instituto Nacional de Chagas "Dr. Mario Fatala Chabén" estableció en 1983 las normas para el diagnóstico de la infección Chagásica, en cumplimiento de la Ley de Chagas 22360 y según lo dispuesto por la Resolución del Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación N° 4 del 6 de enero de 1983.

El artículo N° I de dicha resolución, faculta al ex Instituto Nacional de Chagas, convertido hoy en el Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chabén", perteneciente a la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS), creada por Decreto N° 1 628 del 23-12-96, a revisar y actualizar estas Normas con el fin de adecuarlas a la evolución de los trabajos científicos y asegurar la calidad del diagnóstico. La presente modificación actualiza aquella efectuada el 8 de Noviembre de 1988, por Resolución Ministerial N° 2373.

1

RECOMENDACIONES GENERALES PARA LA ORGANIZACIÓN DE LOS LABORATORIOS.

- 1-1 El diagnóstico de la infección chagásica será realizado en los laboratorios habilitados por la autoridad jurisdiccional para efectuar análisis clínicos y bajo la responsabilidad de un profesional Bioquímico o Licenciado en Análisis Clínicos a cargo y en conocimiento de estas normas.
- 1-2 Los laboratorios llevarán un registro de los resultados y de entrega de certificados según se indica en 3-6.
- 1-3 Los laboratorios habilitados para efectuar diagnóstico serológico de Chagas, deberán instalar un Programa de Control de Calidad Interno y participar en los Programas de Control Interlaboratorio, que coordina el Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chabén". Las pautas para la organización de estas actividades están descriptas en 3-7.
- 1-4 Los Servicios de Hemoterapia y Transfusiones o los Bancos de Sangre deberán orientar a cada uno de los dadores que resultaran reactivos, para confirmar el diagnóstico y para la conducción clínica.

2

RECOMENDACIONES ESPECIALES PARA LOS LABORATORIOS OFICIALES

Se recomienda establecer una Red de laboratorios en cada jurisdicción con

los siguientes objetivos:

- a) Capacitar y actualizar al personal técnico de los Laboratorios,
- b) Asegurar el uso de reactivos controlados en los Laboratorios de la Red, y
- c) Implementar el Control de Calidad Interlaboratorio en cascada desde los laboratorios de mayor a menor complejidad, coordinado por el Laboratorio de Referencia jurisdiccional.

3

NORMAS DE DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *Trypanosoma cruzi*.

El laboratorio tiene gran importancia en el diagnóstico de la infección por *T.cruzi*, ya que los cuadros clínicos encontrados en las fases aguda y crónica, en muy pocos casos tienen signos patognomónicos.

La demostración de la presencia del parásito constituye un diagnóstico de certeza de la Infección. Sin embargo, en la práctica, sólo es posible detectar eficientemente la forma circulante del *T.cruzi* durante la fase aguda de la infección. En etapas posteriores, el diagnóstico de laboratorio se apoya en la detección de elementos que señalen indirectamente la presencia de la infección, tales como antígenos parasitarios circulantes o, más comunmente, anticuerpos séricos. El resultado del inmunodiagnóstico es sólo indicativo de infección y no del estado clínico del paciente.

A continuación se describen los procedimientos de diagnóstico recomendados para cada etapa de la infección. La interpretación de los resultados así como sus ventajas y limitaciones se analizan en el 3-8.

3-1 INVESTIGACIÓN DE CHAGAS AGUDO.

Para el estudio de Pacientes sospechosos de Chagas Agudo se emplearán:

A- Métodos Parasitológicos, que son los recomendados para esta etapa, indicándose en orden creciente de complejidad y sensibilidad los siguiente: a) Gota Fresca y Gota Gruesa b) Método de Strout, c) Método de Capilares, d) Hemocultivo y e) Xenodiagnóstico.

Como se menciona previamente, la detección de parásitos en sangre es una señal inequívoca de la infección por *T. cruzi*.

En los casos de enfermedad de Chagas crónicos, la parasitemia disminuye significativamente respecto de los casos agudos. Una técnica de detección de parásitos bastante sensible como lo es el xenodiagnóstico, que permite la amplificación de parásitos *in vivo*, sólo logra diagnosticar hasta un 50% de los pacientes crónicos.

Existe en la actualidad una técnica de amplificación de material genético llamada PCR (Reacción en Cadena por la enzima Polimerasa) que permite la amplificación *in vivo* de fragmentos de ADN del parásito, con una sensibilidad

superior a la del xenodiagnóstico.

Este método posibilita la detección del parásito, aún cuando en la muestra de sangre, sólo hubiera un 25% del ADN de un único organismo.

B- Métodos Serológicos, para esta etapa los métodos recomendados son: Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) y Aglutinación Directa (AD) con y sin 2- Mercaptoetanol. En todos los casos se determinan Inmunoglobulinas humanas, de los tipos M y G.

El resultado positivo del diagnóstico parasitológico es la certificación de infección por *T. cruzi*. Sin embargo por la modalidad de esta parasitosis, un resultado negativo no indica necesariamente ausencia de infección. Por esta situación se recomienda la reiteración de estos estudios con el seguimiento de la evolución de títulos serológicos en el tiempo en los casos sospechados de infección, como se ve en 3.2, 3.4 y 3.5.

3-2 INVESTIGACIÓN DE LA TRANSMISIÓN MATERNO- INFANTIL.

La mujer gestante se estudiará serológicamente como indica el punto 3-3.

El niño recién nacido, hijo de madre chagásica, se estudiará por los métodos parasitológicos señalados en el punto 3-1 A y serológicos descriptos en 3-1 B. Debido a la transmisión de anticuerpos de la madre al niño durante la gestación, los resultados serológicos obtenidos por las técnicas habituales, antes de los 6 meses de edad no serán indicativos de infección. Sin embargo, en el caso de negatividad parasitológica, se deberá seguir la evolución del título serológico de estos niños durante el primer año de vida. Asimismo, a los hijos de madre chagásica, aún cuando presenten resultados negativos por métodos parasitológicos y serológicos, se deberá seguir la evolución del título serológico durante el primer año de vida.

Estos controles se harán durante el primer mes de vida, al 6º mes y al año. Después del 6º mes, los resultados serológicos reactivos indican presencia de infección.

3-3 INVESTIGACIÓN DE LA INFECCIÓN EN LA ETAPA CRÓNICA.

El diagnóstico de elección en esta etapa es la detección de anticuerpos anti *T.cruzi* en el suero de los pacientes. Se utilizarán por lo menos dos técnicas serológicas normatizadas.

Los métodos parasitológicos no son los indicados para esta etapa por su baja sensibilidad.

Se considerará un resultado "reactivo" para cada prueba serológica, cuando se encuentre reacción del suero en estudio, a la dilución indicada como Título de Corte por el laboratorio productor del antígeno.

El inmunodiagnóstico de la infección deberá realizarse con un mínimo de 2 métodos de los citados a continuación: a) Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), b) Hemaglutinación Indirecta (HAI), c) Ensayo Inmunoenzimático (EIE o ELISA), d) Aglutinación Directa con 2 - Mercaptoetanol (AD-2ME), e) Aglutinación de Partículas (Látex, Gelatina u otras), siempre que hayan sido debidamente estandarizadas y validados por el Centro de Referencia Nacional.

Los reactivos antígenos en uso son de composición muy variable y ninguno alcanza por sí solo el 100% de efectividad en el diagnóstico. Sin embargo, con el empleo de 2 reacciones serológicas se puede alcanzar un rango de sensibilidad entre 98 y 99.5%.

Duplas serológicas que garantizan este rango de sensibilidad:

HAI - IFI

HAI - ELISA

ELISA - IFI

Para el método de ELISA, ya han sido validados equipos con diferentes soportes sólidos (Pocillos o perlas de poliestireno, papel de nitrocelulosa) y antígenos de muy diversa composición (desde poliproteicos hasta pequeños conjuntos de moléculas sintéticas).

Se prevé la aparición de nuevos desarrollos tecnológicos para pruebas de laboratorio, que podrán incorporarse al diagnóstico de la Infección siempre que cumplan con los requisitos establecidos y estén debidamente estandarizados y validados por el Centro de Referencia Nacional.

La descripción pormenorizada de los protocolos técnicos de los métodos Parasitológicos y serológicos citados, se encuentra en el **Manual de Laboratorio. Enfermedad de Chagas y otras Parasitosis**. Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatała Chabén". Séptima Edición. 1994 y subsiguientes.

3-4 CONTROL DE LOS DONANTES DE SANGRE Y DE LA SANGRE A TRANSFUNDIR.

Todos los dadores de sangre deben ser estudiados serológicamente para Chagas. Se utilizarán 2 métodos serológicos de selección o descarte (RSD) o bien los métodos serológicos descritos en el punto 3-3.

Se entiende por RSD a aquellas reacciones que permitan identificar rápidamente los sueros reactivos y que ofrecen un margen de seguridad en la detección.

Estos métodos son: Hemoaglutinación Indirecta (HAI) y Ensayo Inmunoenzimático (ELISA), en los Títulos de Corte correspondientes para selección o descarte, según indique el productor del reactivo usado.

Cuando se obtengan resultados reactivos por 1 o 2 métodos de descarte, deberá desecharse la bolsa de sangre.

El laboratorio que realice la selección o descarte de las muestras reactivas, debe derivar al dador encontrado reactivo, a un laboratorio que pueda confirmar el diagnóstico de infección.

3-5 DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN DE *T.cruzi* EN PACIENTES INMUNOSUPRIMIDOS.

Todo paciente susceptible de recibir o donar un órgano, que padezca enfermedades autoinmunes o SIDA deberán ser estudiados por métodos serológicos de acuerdo al punto 3-3.

A los pacientes receptores reactivos se les efectuará un diagnóstico parasitológico de acuerdo el punto 3-1 A, además de la búsqueda del parásito por hemocultivo.

Para aquellos pacientes que luego de transplante presenten manifestaciones clínicas de enfermedad parasitaria se completarán estos estudios con otros especiales como búsqueda de párasitos en líquido cefaloraquídeo y/o biopsias.

3-6 LIBRO DE REGISTROS Y CERTIFICADOS DE ANÁLISIS

Los laboratorios que efectúan el diagnóstico para Chagas, llevarán un libro diario en el que consten los mismos datos que en el certificado entregado al paciente y cuyo modelo se detalla al pie. El libro deberá estar a disposición para casos de

auditoría. El paciente será registrado en el libro con el mismo número que llevará el certificado que se le entregará con los resultados de sus análisis.

El certificado, confeccionado de acuerdo al modelo siguiente (Pág.6) deberá estar firmado por el profesional responsable.

3-7 CONTROL DE CALIDAD DEL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA INFECCIÓN POR *T.cruzi*.

Teniendo en cuenta las condiciones que existen en Argentina para la realización de la serología de Chagas:

1. se realiza en laboratorios de muy diferente estructura y recursos, establecidos en lugares muy distantes uno de otros y

2. se trata de un diagnóstico serológico que debe realizarse con por lo menos dos métodos para cubrir un rango de sensibilidad lo más alto posible, pues se usan reactivos antigénicos variados, provenientes de cultivos de *T. cruzi*.

CERTIFICADO OFICIAL DE REACCIONES SEROLÓGICAS PARA DETERMINAR INFECCIÓN CHAGASICA	
Ley Nacional Nº 22.360	
Certificado Nº: _____	
LABORATORIO	
Nombre del Organismo. Dirección y Teléfono	
Dependencia Oficial u Organización Privado	
DATOS PERSONALES	
Apellido _____ y	nombre: _____
Nacionalidad: _____	
Lugar de nacimiento: _____	Edad: _____
Tipo y número de Documento de Identidad: _____	
Domicilio _____	actual: _____
Provincia: _____	
INMUNODIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	
Pruebas Serológicas efectuadas (según 2-3)	Resultados (Reactivo, con Título obtenidos, o No Reactivo)
Interpretación de los resultados: El inmunodiagnóstico se considerará reactivo cuando el suero da resultados reactivos con por lo menos dos pruebas serológicas.	
DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO	
Métodos empleados (según 2-1)	Resultados (Positivo o Negativo)
Día, mes y año en que se efectuó el análisis.	
Firma, sello aclaratorio de nombre y matrícula del profesional responsable.	

El Instituto Nacional de Parasitología, Referencia Nacional, diseñó y desarrolla un Programa de Garantía de Calidad del Diagnóstico, contemplando múltiples factores cuya variabilidad impacta en los resultados de las pruebas diagnósticas y que deben ser sistemáticamente considerados en su control y mejoramiento, para asegurar la confiabilidad de esos resultados en el país.

Este diseño está basado fundamentalmente en:

* Operar con una Red de Laboratorios, con Centros de Referencia

Provincial y respetando la autonomía de estos distritos para determinar su cabecera y estructura de red interna.

* Un enfoque de múltiples miradas para el control y el mejoramiento de la calidad del diagnóstico, según el siguiente esquema:

Todo Laboratorio que realice el Diagnóstico de Chagas, cualquiera sea su tamaño y estructura deberá tener un Programa de Control de Calidad Interno, debiendo considerarse en el mismo:

- Política de organización.
- Capacitación técnica permanente del personal,
- Uso de Procedimientos Operativos Estándar validados por el Centro
- Referencial, para Diagnóstico y Control de Calidad,
- Trabajo bajo Buenas Prácticas de Laboratorio,
- Trabajo con Reactivos controlados,
- Monitoreo de Calidad de Procesos Interno (curvas o registro de Sueros de Control diarios),
- Control Externo de Calidad, por el Centro Referencial correspondiente.

Estos items están desarrollados en: **Control de Calidad del Inmunodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Manuales de Procedimientos.** Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chabén". 1994 y subsiguientes.

Se recomienda a los laboratorios tomar como guía del estado de funcionamiento de las reacciones serológicas, el registro diario de resultados de sueros de control o la confección Curvas de Control, graficando diariamente esos resultados.

A continuación se describen los procedimientos para confeccionar los sueros de control, las Curvas de Control, y una orientación para la toma de decisiones en el trabajo diario de laboratorio.

a) Confección de suero de control

De los sueros analizados en la rutina diaria se seleccionarán aquellos positivos o negativos por dos o tres técnicas, los que se conservarán a -20°C . Los sueros seleccionados deberán ser frescos, no lipémicos, no hemolizados, lípidos y sin coloraciones anormales. Cuando se cuente con suficiente cantidad de sueros, estos se descongelarán para hacer 'pooles', de no más de 10 sueros.

Luego de hacer los 'pooles', se les adicionará igual volumen de glicerina neutra y se lo fraccionará en alícuotas. Las mismas se conservarán a -20°C hasta su uso en las determinaciones diarias. Es conveniente preparar sueros de control en cantidad suficiente para 4-6 meses, como mínimo, tomando nuevas alícuotas cada día. Es aconsejable confeccionar 2 sueros de control reactivos, uno de baja y otro de alta reactividad.

b) - Confección de la Curva de Control y su uso

Ejemplo: Curva de control para ELISA

Diariamente deberán incluirse con el procesamiento rutinario de las muestras, alícuotas de sueros de control REACTIVO y otra de suero control NO REACTIVO.

Con los resultados diarios de por lo menos 30 determinaciones, se determinan la Media (X) y la Desviación Estándar (S), ver ejemplo en la figura

adjunta para la reacción de ELISA.

Los resultados diarios de los sueros de control deberán registrarse en una planilla designada para este fin y con los mismos datos se puede construir la curva, como se ejemplifica en la figura adjunta.

Para aceptar los resultados de la analítica de cada día, los mismos deberán estar entre los siguientes límites:

Suero de Control REACTIVO = entre $\pm 2S$.

Suero de Control NO REACTIVO = no $>$ que el Título de corte.

En el ejemplo de la figura, la prueba de ELISA tiene un título de corte de 0,200 Densidad Óptica (lectura a 490 nm).

CONTROL DE LAS PRUEBAS CUALITATIVAS

Para este tipo de pruebas también deben incluirse en la rutina sueros de control REACTIVOS y NO REACTIVOS y registrar sus resultados en una planilla especialmente destinada para esto.

Para aceptar el proceso de análisis, todos los días, estos sueros deberán cumplir la condición de dar resultados:

REACTIVO para sueros de control REACTIVOS y

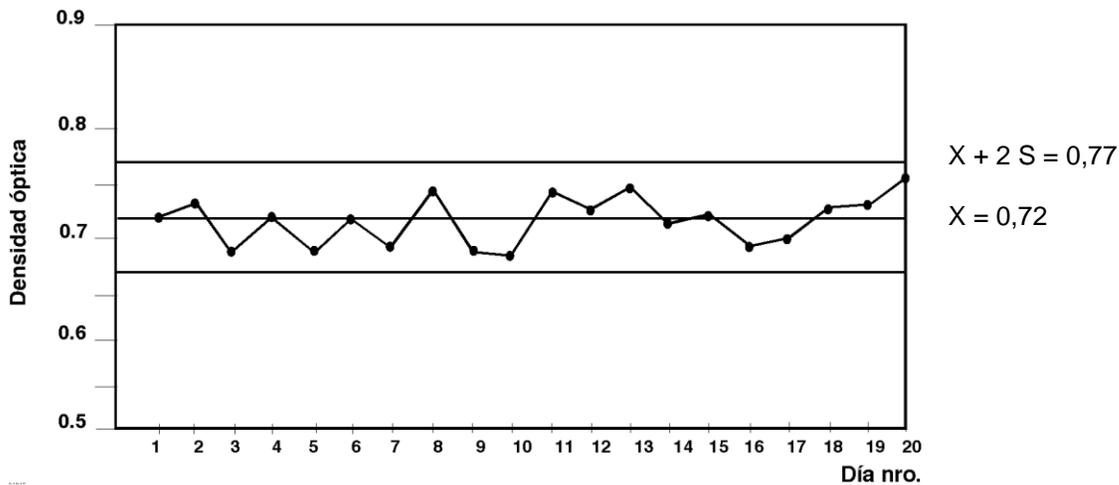
NO REACTIVO para los sueros de control NO REACTIVOS.

ANÁLISIS FUERA DE CONTROL Y MEDIDAS CORRECTIVAS

Cuando los resultados de los sueros de control caen fuera de los límites

Ejemplo: Registro y curva de control de ELISA

	REACTIVO	NO REACTIVO
DIA NRO	D.O 490 nm	D.O 490 nm
1	0.720	0.101
2	0.732	0.094
3	0.690	0.098
4	0.716	0.082
5	0.689	0.094
6	0.721	0.076
7	0.696	0.088
8	0.743	0.111
9	0.690	0.098
10	0.680	0.092
11	0.740	0.079
12	0.722	0.095
13	0.743	0.098
14	0.711	0.099
15	0.720	0.102
16	0.688	0.075
17	0.692	0.096
18	0.726	0.074
19	0.730	0.082
20	0.752	0.076
	$x = \sum x/n = 0.72$	
	$S = 0.027$	



permitidos (o no cumplen las condiciones, para pruebas cualitativas) se debe rechazar el proceso del día y proceder a detectar los errores para corregirlos, de la siguiente forma:

1- Revisar las posibles causas de error, controlando si hubo cambios de operador, diluciones, buffers, conjugados, microscopio o espectrofotómetro, etc. Repetir el proceso, habiendo o no hallado la causa de error.

2- Si se reiteran estas situaciones deberá tenerse en cuenta si ocurren siempre hacia un mismo lado (sesgo de mayor o menor sensibilidad) y de todas maneras en este punto deberá revisarse todo el sistema de prueba. Deberán recalibrarse los materiales con nuevos sueros de referencia.

3- Si aún así no pudiera resolverse el problema, deberá solicitarse la visita de un experto al Laboratorio de Referencia.

3-8 INTERPRETACIÓN DEL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO, VENTAJAS Y LIMITACIONES.

El resultado positivo del diagnóstico parasitológico es la certificación de infección por *T. cruzi*. Sin embargo por la modalidad de esta parasitosis, un resultado negativo no indica necesariamente ausencia de la infección.

El resultado serológico reactivo es indicativo de infección y no del estado clínico del paciente. El mismo servirá de orientación al médico junto con el examen clínico y los antecedentes para llegar al diagnóstico del estado de salud del paciente.

Los resultados serológicos serán informados con títulos obtenidos para cada reacción utilizada. Si bien hasta ahora los títulos serológicos no han mostrado tener correlación con la patología chagásica se recomienda informarlos junto al resultado reactivo. Estos datos tienen significación diagnóstica en los casos de seguimiento, del niño hijo de madre chagásica y de los pacientes inmunosuprimidos.

En el caso de encontrar resultados "No concordantes" entre las dos pruebas serológicas empleadas, se recomienda:

- a) Repetir nuevamente ambos ensayos, para descartar errores operativos.
- b) Efectuar una tercera reacción serológica o remitir la muestra a un laboratorio de mayor complejidad para su resolución.
- c) En caso de persistir la discordancia de resultados, analizar una nueva muestra en un lapso de 20 a 30 días.

